

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, 15/62, 15/14 C12N 5/10, A61K 37/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15200 (43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)
--	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00087
(22) Date de dépôt international: 28 janvier 1993 (28.01.93)

(30) Données relatives à la priorité:
92/01066 31 janvier 1992 (31.01.92) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FLEER, Reinhard [DE/FR]; 47, avenue Beauséjour, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). FOURNIER, Alain [FR/FR]; 28, avenue Roger-Salengro, F-92000 Châtenay-Malabry (FR). GUITTON, Jean-Dominique [FR/FR]; 74, rue Dunois, F-75013 Paris (FR). JUNG, Gérard [FR/FR]; 12, rue des Grands-Jardins, Leuville-sur-Orge, F-91310 Monthéry (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

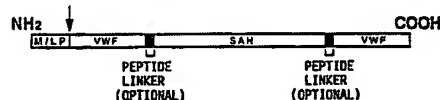
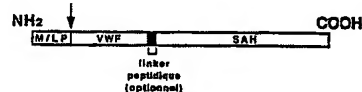
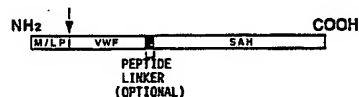
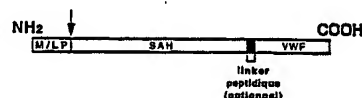
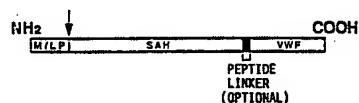
(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(54) Title: ANTITHROMBOTIC POLYPEPTIDES AS ANTAGONISTS OF THE BINDING OF VWF TO PLATELETS OR TO SUBENDOTHELIUM

(54) Titre: POLYPEPTIDES ANTITHROMBOTIQUES, ANTAGONISTES DE LA LIAISON DU VWF AUX PLAQUETTES ET/OU AU SOUS-ENDOTHELIUM



(57) Abstract

Recombinant polypeptides consisting of an adhesive portion derived from the structure of the vWF which is at least partially antagonistic to the bond between said vWF and the platelets and/or the subendothelium, as well as a portion for stabilising and presenting it *in vivo*; preparation thereof; and pharmaceutical compositions containing said polypeptides.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des polypeptides recombinants composés d'une partie adhésive dérivée de la structure du vWF capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, et d'une partie permettant sa stabilisation et sa présentation *in vivo*, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

POLYPEPTIDES ANTITHROMBOTIQUES, ANTAGONISTES DE LA LIAISON DU VWF AUX PLAQUETTES ET/OU AU SOUS-ENDOTHELIUM.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides
5 antithrombotiques, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides comportant une partie dérivée de la structure du facteur de von Willebrand (vWF) et intrinsèquement capable de se fixer aux plaquettes sanguines et/ou au sous-endothélium.

10 Le vWF est une protéine glycosylée de 2813 acides aminés comprenant une séquence signal de 22 résidus, un région "pro" de 741 résidus et une protéine mature de 2050 acides aminés organisée en plusieurs structures répétées [Titani K. et al., Biochemistry 25 (1986) 3171-3184; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847]. Cette glycoprotéine complexe est présente *in vivo*, soit stockée dans des
15 vésicules spécialisées des cellules endothéliales ou des plaquettes, soit sous forme circulante dans le plasma sanguin après sécrétion et maturation protéolytique lors du processus de sécrétion. Les formes circulantes du vWF sont présentes sous la forme de multimères de haut poids moléculaire (jusqu'à 20 000 kDa) et dont le protomère est un dimère d'environ 450 kDa. Le gène du vWF a été cloné et séquencé par
20 plusieurs équipes et mappé sur le bras court du chromosome 12 [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171; Bonthron D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127; Ginsburg D. et al., Science 228 (1985) 1401-1406].

25 Le vWF est impliqué dans la génèse des thrombus artériels par une interaction complexe et mal comprise entre certains composants du sous-endothélium d'une part et les plaquettes sanguines d'autre part (et notamment les récepteurs GP1b plaquettaires). Un point important est que le vWF plasmatique circulant ne lie pas spontanément les récepteurs GP1b des plaquettes, et il est
30 vraisemblable que son interaction avec le sous-endothélium soit nécessaire pour démasquer son (ses) site(s) d'interaction avec les plaquettes, par exemple à la suite d'un changement conformationnel du vWF. L'interaction entre le vWF ainsi activé et

les GP1b plaquettaires conduit à l'activation des plaquettes sanguines qui acquièrent alors la capacité de s'aggréger et de générer un thrombus fibrino-cellulaire en présence de certaines protéines adhésives (fibrinogène, thrombospondine, vWF etc..).

5 Compte tenu de son rôle précoce dans l'activation plaquettaire, le vWF constitue une cible pharmacologique de choix pour la réalisation d'agents antithrombotiques. Toutefois, de nombreuses difficultés doivent être surmontées pour pouvoir exploiter cette molécule sur le plan pharmacologique : l'incapacité du vWF circulant à lier les plaquettes, la méconnaissance de la contribution respective
10 des différentes fonctions adhésives du vWF (sous-endothélium et plaquettes) dans son activité thrombogénique, la difficulté de produire à des niveaux suffisamment élevés des produits suffisamment purs et homogènes pour pouvoir être utilisés comme agents thérapeutiques, la taille importante du vWF et sa complexité, la dynamique de sa structure tertiaire, etc... Certains fragments du vWF ont été obtenus
15 par digestion protéolytique et étudiés sur le plan pharmacologique. Des fragments recombinants ont également été produits [EP 255 206 ; Sugimoto M. et al., Biochemistry 30 (1991) 5202-5209 ; Azuma H. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 12342-12347]. Il ressort de ces études que les molécules obtenues ne sont pas totalement satisfaisantes, et en particulier, ne se comportent pas comme des
20 antagonistes optimaux de l'interaction vWF-plaquettes en l'absence de certains ligands non physiologiques (tels que la ristocétine ou la botrocétine par exemple), ou encore doivent être modifiés chimiquement (réduction et alkylation par exemple), probablement pour démasquer les sites cryptiques de liaison du vWF à la GP1b plaquettaire.

25 La présente invention fournit de nouvelles molécules intrinsèquement capables d'antagoniser au moins partiellement l'activation plaquettaire. Les molécules de l'invention comportent une partie adhésive dérivée de la structure du vWF et une partie permettant sa présentation fonctionnelle et assurant la stabilité et la distribution in vivo de la molécule. La demanderesse a en effet montré qu'il est
30 possible de coupler génétiquement le vWF à une structure de nature protéique, et de produire de telles molécules à des niveaux satisfaisants. Les molécules de l'invention permettent de plus de générer et d'utiliser de petites structures dérivées du vWF et donc très spécifiques d'un effet recherché (par exemple antagonistes de la seule

interaction vWF-GP1b). La demanderesse a par ailleurs montré qu'un tel couplage favorisait la présentation de cette structure à son/ses sites de liaison. Les polypeptides de l'invention permettent donc d'exposer, au sein d'une structure stable, des structures dérivées du vWF capables d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes, et de ce fait d'inhiber l'activation plaquettaire. Les polypeptides de l'invention permettent également d'exposer, au sein d'une structure stable, des structures dérivées du vWF capables d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au sous-endothélium.

Un objet de la présente invention concerne donc des molécules comportant une partie adhésive dérivée de la structure du vWF capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, et une partie de nature protéique permettant sa stabilisation et sa présentation in vivo.

Plus particulièrement, dans les molécules de l'invention, la partie adhésive est constituée par tout ou partie de la séquence peptidique comprise entre les résidus 445-733 du vWF ou d'un variant de celle-ci. La séquence peptidique du vWF ayant été publiée, la numérotation des résidus de la partie adhésive des molécules de l'invention se réfère à la numérotation de la séquence du vWF publiée par Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Il est entendu que cette fonction peut être redondante au sein des molécules de la présente invention. Une partie de cette séquence du vWF (résidus Thr470 à Val713) est indiquée à la Figure 1, dans laquelle elle est couplée en C-terminal de la sérum-albumine humaine.

Au sens de la présente invention, le terme variant désigne toute molécule obtenue par modification de la séquence capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification obtenue, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique. De tels variants peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité de la molécule pour son (ses) site(s) de fixation, celui d'améliorer ses niveaux de production, celui de réduire sa susceptibilité à des protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou encore de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés

pharmacocinétiques ou biologiques telles que notamment des fonctions adhésives exprimée de façon intrinsèquement non cryptique.

Des polypeptides de l'invention particulièrement avantageux sont ceux dans lesquels la partie adhésive présente:

- 5 (a) la séquence peptidique comprise entre les résidus 445-733 du vWF, ou,
(b) une partie de la séquence peptidique (a) capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
(c) une structure dérivée des structures (a) ou (b) par modifications structurales (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus)
10 et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
(d) une séquence peptidique non naturelle, par exemple isolée à partir de banques peptidiques et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium.

- 15 Parmi les structures du type (b), on peut citer plus particulièrement celles ayant conservé la capacité d'antagoniser l'interaction entre le vWF et la GP1b plaquettaire, telles que par exemple les peptides G10 ou D5 décrits par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904], ou les peptides ayant conservé la capacité de lier le collagène [Pareti F.I. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 15310-15315 ; Roth
20 G.J. et al. Biochemistry 25 (1986) 8357-8361], et/ou l'héparine [Fujimura Y. et al. J. Biol. Chem. 262 (1987) 1734-1739] et/ou la botrocétine [Sugimoto M. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 18172-18178], et/ou les sulfatides [Christophe O. et al. Blood 78 (1991) 2310-2317] et/ou la ristocétine etc., ou toute combinaison entre ces différentes fonctions adhésives.

- 25 Les structures du type (c) comprennent par exemple les molécules dans lesquelles certains sites de N- ou O-glycosylation ont été modifiés ou supprimés, ainsi que les molécules dans lesquelles un, plusieurs, voire tous les résidus cystéine ont été substitués, ou encore des mutants ponctuels et/ou multiples concernant au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type IIB associées au vWF comme
30 les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val553 ou Arg578 par exemple. Elles comprennent également des molécules obtenues à partir de (a) ou (b) par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés, et des molécules comportant par rapport à (a) ou (b) des résidus supplémentaires, tels que par exemple une méthionine N-terminale et/ou une

séquence signal de sécrétion et/ou un adaptateur polypeptidique permettant la jonction à la structure stabilisatrice.

A titre d'exemple on peut citer des polypeptides de l'invention comportant la structure stabilisatrice couplée:

- 5 - à un peptide de type P1 dont la version minimale correspond au peptide G10 compris entre les résidus Cys474 et Pro488 du vWF, ou,
- à un peptide de type P2 dont la version minimale correspond au peptide D5 compris entre les résidus Leu694 et Pro708 du vWF ou,
- à un peptide de type X ou XD qui correspondent respectivement au
10 fragment du vWF compris entre les résidus Pro488 et Leu694, et ses variants obtenus par délétion, ou,
- à un peptide de type X* défini comme tout variant moléculaire des peptides de type X et XD, ou,
- à toute combinaison de ces peptides, et entre autres :
15 - les peptides de type P1-P2 ;
 - les peptides de type P1-X, P1-XD, P1-X* ;
 - les peptides de type X-P2, XD-P2, X*-P2 ;
 - les peptides de type P1-X-P2 ;
 - les peptides de type P1-XD-P2 ;
20 - les peptides de type P1-X*-P2 ;
 - tout peptide adhésif tel que défini plus avant et représenté plus d'une fois au sein de la molécule de l'invention.

La partie adhésive des molécules de l'invention peut être couplée, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un peptide de jonction à la structure stabilisatrice protéique. De plus, elle peut constituer l'extrémité N-terminale comme
25 l'extrémité C-terminale de la molécule. Préférentiellement, dans les molécules de l'invention, la partie adhésive constitue la partie C-terminale de la chimère.

Préférentiellement, la structure stabilisatrice des polypeptides de l'invention est un polypeptide possédant une demi-vie plasmatique élevée. A titre d'exemple, il
30 peut s'agir d'une protéine telle qu'une albumine, une apolipoprotéine, une immunoglobuline ou encore une transferrine, etc... Il peut également s'agir de peptides dérivés de telles protéines par modifications structurales, ou de peptides

synthétisés artificiellement ou semi-artificiellement, et possédant une demie-vie plasmatique élevée. Par ailleurs, la structure stabilisatrice utilisée est plus préférentiellement un polypeptide faiblement ou non-immunogénique pour l'organisme dans lequel le polypeptide de l'invention est utilisé.

5 Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, la structure stabilisatrice est une albumine ou un variant de l'albumine et par exemple la sérum-albumine humaine (SAH). Il est entendu que les variants de l'albumine désignent toute protéine à haute demie-vie plasmatique obtenue par modification (mutation, délétion et/ou addition) par les techniques du génie génétique d'un gène
10 codant pour un isomorphe donné de la sérum-albumine humaine, ainsi que toute macromolécule à haute demie-vie plasmatique obtenue par modification *in vitro* de la protéine codée par de tels gènes. L'albumine étant très polymorphe, de nombreux variants naturels ont été identifiés et répertoriés [Weitkamp L.R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219]. A titre d'exemple, les chimères entre la (les) dite(s)
15 fonction(s) adhésive(s) et la SAH mature possèdent des propriétés pharmacocinétiques et des activités antithrombotiques particulièrement utiles en thérapeutique.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation des molécules chimères décrites ci-avant. Plus précisément, ce procédé consiste à faire
20 exprimer par un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide désiré, puis à récolter le polypeptide produit.

Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces,
25 Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, CI27, etc... Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries telles que Escherichia coli, ou appartenant aux genres
30 Corynebacterium, Bacillus, ou Streptomyces.

Les séquences nucléotidiques utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être préparées de différentes manières. Généralement, elles sont

obtenues en assemblant en phase de lecture les séquences codant pour chacune des parties fonctionnelles du polypeptide. Celles-ci peuvent être isolées par les techniques de l'homme de l'art, et par exemple directement à partir des ARN messagers (ARNm) cellulaires, ou par reclonage à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) effectuée à partir de cellules productrices, ou encore il peut s'agir de séquences nucléotidiques totalement synthétiques. Il est entendu de plus que les séquences nucléotidiques peuvent également être ultérieurement modifiées, par exemple par les techniques du génie génétique, pour obtenir des dérivés ou des variants desdites séquences.

10 Plus préférentiellement, dans le procédé de l'invention, la séquence nucléotidique fait partie d'une cassette d'expression comprenant une région d'initiation de la transcription (région promoteur) permettant, dans les cellules hôtes, l'expression de la séquence nucléotidique placée sous son contrôle et codant pour les polypeptides de l'invention. Cette région peut provenir de régions promoteurs de
15 gènes fortement exprimés dans la cellule hôte utilisée, l'expression étant constitutive ou régulable. S'agissant de levures, il peut s'agir du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), de la lactase (LAC4), des émolases (ENO), des alcools deshydrogénases (ADH), etc... S'agissant de bactéries, il peut s'agir du promoteur des gènes droit ou
20 gauche du bactériophage lambda (P_L, P_R), ou encore des promoteurs des gènes des opérons tryptophane (P_{trp}) ou lactose (P_{lac}). En outre, cette région de contrôle peut être modifiée, par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. La cassette d'expression peut
25 également comprendre une région de terminaison de la transcription fonctionnelle dans l'hôte envisagé, positionnée immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention.

Dans un mode préféré, les polypeptides de l'invention résultent de l'expression dans un hôte eucaryote ou procaryote d'une séquence nucléotidique et de
30 la sécrétion du produit d'expression de ladite séquence dans le milieu de culture. Il est en effet particulièrement avantageux de pouvoir obtenir par voie recombinante des molécules directement dans le milieu de culture. Dans ce cas, la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention est précédée d'une séquence "leader" (ou séquence signal) dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de

sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence signal naturelle du vWF ou de la structure stabilisatrice dans le cas où celle-ci est une protéine naturellement sécrétée, mais il peut également s'agir de toute autre séquence "leader" fonctionnelle, ou d'une séquence "leader" artificielle. Le choix de l'une ou l'autre de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé. Des exemples de séquences signal fonctionnelles incluent celles des gènes des phéromones sexuelles ou des toxines "killer" de levures.

En plus de la cassette d'expression, un ou plusieurs marqueurs permettant de sélectionner l'hôte recombiné peuvent être additionnés, tels que par exemple le gène URA3 de la levure S. cerevisiae, ou des gènes conférant la résistance à des antibiotiques comme la généticine (G418) ou à tout autre composé toxique comme certains ions métalliques.

L'ensemble constitué par la cassette d'expression et par le marqueur de sélection peut être introduit, soit directement dans les cellules hôtes considérées, soit inséré préalablement dans un vecteur autorépliquatif fonctionnel. Dans le premier cas, des séquences homologues à des régions présentes dans le génôme des cellules hôtes sont préférentiellement additionnées à cet ensemble; lesdites séquences étant alors positionnées de chaque côté de la cassette d'expression et du gène de sélection de façon à augmenter la fréquence d'intégration de l'ensemble dans le génôme de l'hôte en ciblant l'intégration des séquences par recombinaison homologue. Dans le cas où la cassette d'expression est insérée dans un système répliquatif, un système de réplication préféré pour les levures du genre Kluyveromyces est dérivé du plasmide pKD1 initialement isolé de K. drosophilum; un système préféré de réplication pour les levures du genre Saccharomyces est dérivé du plasmide 2 μ de S. cerevisiae. De plus, ce plasmide d'expression peut contenir tout ou partie desdits systèmes de réplication, ou peut combiner des éléments dérivés du plasmide pKD1 aussi bien que du plasmide 2 μ .

En outre, les plasmides d'expression peuvent être des vecteurs navettes entre un hôte bactérien tel que Escherichia coli et la cellule hôte choisie. Dans ce cas, une origine de réplication et un marqueur de sélection fonctionnant dans l'hôte bactérien sont requises. Il est également possible de positionner des sites de restriction entourant les séquences bactériennes et uniques sur le vecteur d'expression : ceci permet de supprimer ces séquences par coupure et religature in vitro du vecteur tronqué avant transformation des cellules hôtes, ce qui peut résulter

en une augmentation du nombre de copies et en une stabilité accrue des plasmides d'expression dans lesdits hôtes. Par exemple, de tels sites de restriction peuvent correspondre aux séquences telles que 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) ou 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) dans la mesure où ces sites sont extrêmement rares et
5 généralement absents d'un vecteur d'expression.

Après construction de tels vecteurs ou cassette d'expression, ceux-ci sont introduits dans les cellules hôtes retenues selon les techniques classiques décrites dans la littérature. A cet égard, toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule peut être utilisée. Il peut s'agir notamment de
10 transformation, électroporation, conjugaison, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. A titre d'exemple pour les hôtes de type levure, les différentes souches de Kluyveromyces utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. [J. Bacteriol. 153 (1983) 163]. La technique de
15 transformation décrite par Durrens et al. [Curr. Genet. 18 (1990) 7] utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, selon la méthode décrite par Karube et al. [FEBS Letters 182 (1985) 90]. Un protocole alternatif est également décrit en détail dans les exemples qui suivent.

20 Après sélection des cellules transformées, les cellules exprimant lesdits polypeptides sont inoculées et la récupération desdits polypeptides peut être faite, soit au cours de la croissance cellulaire pour les procédés "en continu", soit en fin de croissance pour les cultures "en lots" ("batch"). Les polypeptides qui font l'objet de la présente invention sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture en vue de
25 leur caractérisation moléculaire, pharmacocinétique et antithrombotique.

Un système d'expression préféré des polypeptides de l'invention consiste en l'utilisation des levures du genre Kluyveromyces comme cellule hôte, transformées par certains vecteurs dérivés du réplicon extrachromosomique pKD1 initialement isolé chez K. marxianus var. drosophilum. Ces levures, et en particulier K. lactis et
30 K. fragilis sont généralement capables de répliquer lesdits vecteurs de façon stable et possèdent en outre l'avantage d'être incluses dans la liste des organismes G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe"). Des levures privilégiées sont préférentiellement

des souches industrielles du genre Kluyveromyces capables de répliquer de façon stable lesdits plasmides dérivés du plasmide pKD1 et dans lesquels a été inséré un marqueur de sélection ainsi qu'une cassette d'expression permettant la sécrétion à des niveaux élevés des polypeptides de l'invention.

- 5 La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides chimères décrits ci-avant, ainsi que les cellules recombinantes, eucaryotes ou procaryotes, comprenant de telles séquences.

- 10 La présente invention concerne aussi l'application à titre de médicament des polypeptides selon la présente invention. Plus particulièrement, l'invention a pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides tel que décrit ci-avant. Plus particulièrement, ces compositions peuvent être utilisées pour la prévention ou le traitement des thromboses.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

15

LISTE DES FIGURES

Les représentations des plasmides indiquées dans les Figures suivantes ne sont pas tracées à l'échelle et seuls les sites de restriction importants pour la compréhension des clonages réalisés ont été indiqués.

- 20 **Figure 1 :** Séquence nucléotidique d'un fragment de restriction HindIII codant pour une protéine chimère du type SAH-vWF. Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Les sites de restriction MstII et PstI sont soulignés. La numérotation des acides aminés (colonne de droite) correspond à la protéine chimère SAH-vWF470->713 mature (829 résidus) ; le fragment Thr470-Val713 du vWF de cette chimère particulière est numéroté des résidus Thr586 à
25 Val829. Les résidus Thr470, Leu494, Asp498, Pro502, Tyr508, Leu694, Pro704, et Pro708 du vWF mature sont soulignés.

- Figure 2 :** Schématisation des chimères du type SAH-vWF (A), du type vWF-SAH (B) ou vWF-SAH-vWF (C). Abréviations utilisées : M/LP, résidu méthionine initiateur de la traduction, éventuellement suivi d'une séquence signal de
30 sécrétion ; SAH, sérum-albumine humaine mature ou un de ses variants ; vWF,

fragment(s) du vWF possédant une propriété de fixation aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, ou un (des) variants obtenus par les techniques du génie génétique. La flèche noire indique l'extrémité N-terminale de la protéine mature.

- Figure 3 :** A, carte de restriction du plasmide pYG105 et stratégie de construction des plasmides d'expression des protéines chimères de la présente invention. Abréviations utilisées : P, promoteur transcriptionnel ; T, terminateur transcriptionnel ; IR, séquences répétées inversées du plasmide pKD1 ; LPSAH, région "prépro" de la SAH; Ap^r et Km^r désignent respectivement les gènes de résistance à l'ampicilline (*E. coli*) et au G418 (levures).
- 10 B, caractéristiques et filiation génétiques des principaux plasmides d'expression des hybrides entre SAH et vWF exemplifiés dans la présente invention. Les plasmides de la première colonne sont des plasmides de type pUC comportant un fragment de restriction HindIII correspondant à des fusions traductionnelles entre la totalité de la SAH et un fragment ou un variant moléculaire
- 15 du vWF. Les plasmides d'expression correspondent au clonage dans l'orientation productive de ces fragments HindIII dans le site HindIII du plasmide pYG105 (LAC4).

- Figure 4 :** Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1248
- 20 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P1-X-P2) et pKan707 (plasmide contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5%) puis traités séparément.

- A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2) ; surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707
- 25 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

- C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation
- 30 d'anticorps de lapin dirigés contre l'albumine humaine: surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 2) ou YPL (piste 3).

Figure 5 : Cinétique de sécrétion d'une chimère du type SAH-P2 par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206.

A, coloration au bleu de coomassie ; standard de poids moléculaire (piste 1) ; surnageant équivalent à 2,5 µl d'une culture "Fed Batch" en milieu YPD après 24h. (piste 2), 40h. (piste 3) ou 46h. (piste 4) de croissance.

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

Figure 6 : Caractérisation du matériel sécrété par *K. lactis* transformé par les plasmides pKan707 (plasmide contrôle, piste 2), pYG1206 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P2, piste 3), pYG1214 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P1, piste 4) et pYG1223 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-P1-XD-P2, piste 5) ; standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts correspondent à 50 µl de surnageant d'une culture stationnaire après croissance en milieu YPD, migration dans un gel à 8.5 % d'acrylamide et coloration au bleu de coomassie.

Figure 7 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1311 (SAH-vWF508->704) et pYG1313 (SAH-vWF470->704, C471G, C474G), après migration sur gel SDS-PAGE à 8,5 %.

A, coloration au bleu de coomassie; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1311 (piste 1) ou pYG1313 (piste 2) en milieu YPL ; standard de poids moléculaire (piste 3).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre la SAH : même légende qu'en A.

Figure 8 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1361 (SAH-vWF470->704, C471G, C474G, R543W) et pYG1365 (SAH-vWF470->704, C471G, C474G, P574L), après migration sur gel SDS-PAGE à 8,5 %. Dans cette

expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1361 (piste 1) ou pYG1365 (piste 2) en milieu YPL; standard de poids moléculaire (piste 3).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre la SAH : même légende qu'en A.

Figure 9 : Dosage de l'activité antagoniste *in vitro* de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au paraformaldéhyde : CI50 des hybrides SAH-vWF694-708, [SAH-vWF470-713 C471G, C474G] et [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] relativement à l'étalon RG12986. La détermination de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination plaquettaire est réalisée sous agitation à 37°C, en utilisant un agrégamètre PAP-4, en présence de vWF humain, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions. La concentration du produit permettant d'inhiber de moitié l'agglutination contrôle (absence de produit) est alors déterminée (CI50).

EXEMPLES

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli* etc... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont
5 d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

10 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un
15 traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de
20 PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode
25 développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

La numérotation des acides aminés du vWF est celle de Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184].

Les transformations de K. lactis avec l'ADN des plasmides d'expression des
30 protéines de la présente invention sont effectuées par toute technique connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont E. coli MC1060 (lacIPZYA, X74, galU, galK, strA^r), ou E. coli TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5 / F'traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZ, M15).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre Kluyveromyces. Les souche K. lactis MW98-8C (a, uraA, arg, lys, K^+ , pKD1^o) et K. lactis CBS 293.91 ont été particulièrement utilisées; un échantillon de la souche MW98-8C a été déposé le 16
5 Septembre 1988 au Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) à Baarn (Pays Bas) où il a été enregistré sous le numéro CBS 579.88.

Une souche bactérienne (E. coli) transformée avec le plasmide pET-8c52K a été déposée le 17 Avril 1990 auprès de l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 68306.

10 Les souches de levures transformées par les plasmides d'expression codant pour les protéines de la présente invention sont cultivées en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD: 1 % yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % glucose ; ou YPL : 1 % yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % lactose) sous agitation constante.

15 EXEMPLE 1: CONSTRUCTION DU PLASMIDE pET-8c52K ET DE SES VARIANTS MOLECULAIRES

Le fragment du cDNA du vWF codant pour les résidus 445 à 733 du vWF humain possède plusieurs déterminants cruciaux de l'interaction entre le vWF et les plaquettes d'une part, et certains éléments de la membrane basale et du tissu sous-
20 endothelial d'autre part. L'amplification de ces déterminants génétiques peut être réalisée, par exemple à partir d'une lignée cellulaire humaine exprimant le vWF, et par exemple d'une lignée de cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain [Verweij C.L. et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4699-4717], ou encore à partir d'ARN de plaquettes humaines, par exemple selon le protocole décrit par Ware
25 et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 2946-2950]. Les ARN cellulaires sont purifiés en utilisant la technique d'extraction au thiocyanate de guanidium initialement décrite par Cathala et al. [DNA 4 (1983) 329-335] et utilisés comme matrice à la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) incluant la partie du vWF à amplifier. Dans un premier temps, la synthèse du brin non codant se fait en utilisant
30 le kit distribué par Amersham et un oligodéoxynucléotide complémentaire de la séquence nucléotidique de l'ARNm codant pour des résidus contigus localisés en C-terminal de la partie à amplifier. La solution résultante est ensuite soumise à 30 cycles d'amplification enzymatique par la technique PCR, en utilisant comme

amorce l'oligodéoxynucléotide précédent et un oligodéoxynucléotide identique à la séquence nucléotidique codant pour des résidus contigus localisés en N-terminal de la partie du vWF à amplifier. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans des vecteurs du type M13 en vue de leur vérification par séquençage en utilisant soit les
5 amorces universelles situées de part et d'autre du multisite de clonage, soit des oligodéoxynucléotides spécifiques de la région amplifiée du gène du vWF dont la séquence de plusieurs isomorphes est connue [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398 ; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847 ; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171 ; Bonthron D. et al.,
10 Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127]. Le plasmide pET-8c52K est particulièrement utile car il comporte un fragment du cDNA du vWF codant pour les résidus 445 à 733 du vWF humain et inclus notamment les peptides G10 et D5 antagonistes de l'interaction entre vWF et GP1b [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Le fragment du vWF présent dans le plasmide p5E est
15 identique au fragment du vWF du plasmide pET-8c52K à l'exception que les résidus cystéine aux positions 459, 462, 464, 471 et 474 ont été mutés en résidus glycine par mutagenèse dirigée. Le plasmide p7E est identique au plasmide p5E à l'exception que les résidus cystéine aux positions 509 et 695 ont également été mutés en résidus glycine par mutagenèse dirigée.

20 **EXEMPLE 2: CONSTRUCTION D'UN FRAGMENT DE RESTRICTION MstII-HindIII INCLUANT UN SITE DE LIAISON DU vWF AUX PLAQUETTES SANGUINES**

E.2.1. Peptide du type P1-X-P2.

E.2.1.1. Résidus Thr470-Val713 du vWF.

25 L'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, les sites BamHI et MstII sont soulignés) et 5'-CCCGGGATCCAAGC-TTAGACTTGTGCCATGTCG-3' (Sq2029, les sites BamHI et HindIII sont soulignés), génère un fragment incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF (cf.
30 Figure 1, résidus Thr586 à Val829). Les fragments amplifiés sont d'abord coupés par BamHI, clonés dans le site BamHI d'un vecteur de type pUC et la séquence d'un clone est vérifiée par séquençage. La séquence peptidique ainsi amplifiée comporte un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du

vWF et dont la séquence peptidique est identique à la séquence correspondante décrite par Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Le plasmide pYG1220 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

5 E.2.1.2. Résidus Thr470-Pro704 du vWF.

Le résidue 705 du vWF naturel est O-glycosylé et se situe à l'intérieur du peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. De plus il est connu qu'un traitement du vWF naturel par une neuraminidase, dont la fonction est de libérer les acides sialiques
10 terminaux des glycosylations des cellules de mammifères, permet d'exposer les sites de liaisons du vWF à la GPIb plaquettaire en l'absence de cofacteurs de l'agglutination plaquettaire tel que la botrocétine par exemple. Il est donc possible que la suppression de tout ou partie des sites de O-glycosylation du vWF recombinant, et notamment sécrété par une levure dont il est admis que la O-
15 glycosylation est dépourvue d'acides sialiques, génère un produit intrinsèquement capable de reconnaître la GPIb plaquettaire en l'absence de tels cofacteurs. Un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Pro704 du vWF est donc généré de façon similaire à l'exemple précédent: les fragments résultant de l'amplification PCR du plasmide p5E avec les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGG-
20 GATCCCTTAGGCTTAACCGGTGAAGCCGGC-3' (Sq2149, les sites BamHI et MstII sont soulignés) et 5'-CCATGGATCCAAGCTTAAGGAGGAGGGGCTTCA-
GGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) sont d'abord clonés dans un vecteur de type pUC sous la forme d'un fragment de restriction BamHI, et la séquence d'un clone est vérifiée par séquençage. La
25 séquence du fragment MstII-HindIII ainsi généré correspond à la séquence correspondante donnée à la Figure 1 à l'exception que le codon TAA spécifiant l'arrêt traductionnel est localisé immédiatement en aval du résidu Pro704 du vWF et que les résidus 471 et 474 sont des résidus glycine et non des résidus cystéine. Le plasmide pYG1310 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment
30 HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.1.3. Résidus Leu494-Pro704 du vWF.

La séquence peptidique présente dans le plasmide pYG1310 possède encore les résidus thréonine ou sérine aux positions 485, 492, 493 et 500 qui sont naturellement O-glycosylés dans la molécule native du vWF humain, localisés à

proximité immédiate du peptide G10 défini par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. L'amplification par la technique PCR du plasmide pET8C-52K par les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGGGTACCTTAGG-CTTACTGTATGTGGAGGACATC-3' (Sq3037, les sites KpnI et MstII sont soulignés) et 5'-CCATGGATCCAAGCTTAAGGAGGAGGGGCTTCAGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) génère un fragment incluant les résidus Leu494 à Pro704 du vWF. Les fragments amplifiés sont d'abord coupés par les enzymes KpnI et BamHI pour être clonés dans un vecteur de type pUC coupé par les mêmes enzymes. Un clone particulier est isolé qui correspond à la séquence attendue vérifiée par séquençage. Ce fragment KpnI-BamHI comporte donc un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Leu494 à Pro704 du vWF humain. Le plasmide pYG1373 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

15 E.2.1.4. Résidus Tyr508-Pro704 du vWF.

La séquence peptidique présente après amplification PCR dans le plasmide pYG1373 possède encore le résidu thréonine à la position 500 qui est naturellement O-glycosylé dans la molécule native du vWF humain. L'amplification par la technique PCR du plasmide pET8C-52K par les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGG-20 GTACCTTAGGCTTATACTGCAGCAGGCTACTGGACCTG-3' (Sq2621, les sites KpnI et MstII sont soulignés) et 5'-CCATGGATC-CAAGCTTAAGGAGGAGGGGCTTCAGGGGCAAGGTC-3' (Sq2622, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) génère un fragment incluant les résidus Tyr508 à Pro704 du vWF. Les fragments amplifiés sont d'abord coupés par les enzymes KpnI et BamHI pour être clonés dans un vecteur de type pUC coupé par les mêmes enzymes. Un clone particulier est isolé qui correspond à la séquence attendue vérifiée par séquençage. Ce fragment KpnI-BamHI comporte donc un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Tyr508 à Pro704 du vWF humain. Le plasmide pYG1309 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

30 E.2.1.5. Résidus Pro502-Pro704 du vWF.

La séquence peptidique correspondant aux résidus Pro502 à Pro704 du vWF humain est générée à partir du plasmide précédent par insertion des oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGGTTACCACCTTTGCATGACTTCTACTGCA-3'

(Sq2751) et 5'-GTAGAAAGTCATGCAAAGGTGGTAACCC-3' (Sq2752) qui en s'appariant peuvent être clonés entre les sites MstII et PstI du plasmide obtenu après amplification PCR selon l'exemple E.2.1.4., ce qui permet de générer un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Pro502 à Pro704 du vWF humain. Le
 5 plasmide pYG1350 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.2. Résidus Thr470-Asp498 du vWF: peptide du type P1.

Dans un mode de réalisation particulier, le site de liaison du vWF est un peptide incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF mature. Cette séquence inclus
 10 le peptide G10 (Cys474-Pro488) décrit par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904] et capable d'antagoniser l'interaction du vWF humain à la GP1b des plaquettes humaines. La séquence incluant le peptide G10 est d'abord générée sous la forme d'un fragment de restriction MstII-HindIII, par exemple au moyen de la technique d'amplification PCR, ou encore directement à l'aide
 15 d'oligodéoxynucléotides synthétiques. Par exemple, les produits de l'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et 5'-CCCG-GGATCCAAGCTTAGTCCTCCACATACAG-3' (Sq1970, les sites BamHI et HindIII sont soulignés) sont d'abord coupés par l'enzyme BamHI puis clonés dans le site BamHI d'un vecteur de type pUC. Un clone particulier est isolé qui correspond
 20 à la séquence attendue vérifiée par séquençage. Ce fragment BamHI comporte donc un fragment MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF humain. Le plasmide pYG1210 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.3. Résidus Leu694-Pro708 du vWF: peptide du type P2.

Dans un second mode de réalisation, le site de liaison du vWF à la GP1b est directement conçu à l'aide d'oligodéoxynucléotides synthétiques, et par exemple les
 25 oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCTG-AAGCCCCTCCTCTACTCTGCCCCCTAAGCTTA-3' et 5'-GATC-TAAGCTTAGGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGGCTTCAGGGGCAAGGTC-
 30 ACAGAGGCC-3'. Ces oligodéoxynucléotides forment en s'appariant un fragment de restriction MstII-BglII incluant le fragment MstII-HindIII correspondant au peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Le plasmide pYG1204 comporte ce fragment de

restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B).

E.2.4. Peptide du type P1-XD-P2.

Des variants utiles du plasmide pET-8c52K sont délétés par mutagenèse dirigée entre les peptides G10 et D5, par exemple des sites de fixation au collagène, et/ou à l'héparine, et/ou à la botrocétine, et/ou aux sulfatides et/ou à la ristocétine. Un exemple est le plasmide pMMB9 délété par mutagenèse dirigée entre les résidus Cys509 et Ile662. L'amplification PCR de ce plasmide avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et Sq2029 génère un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Tyr508 et Arg663 à Val713 et en particulier les peptides G10 et D5 du vWF et délété en particulier de son site de fixation au collagène localisé entre les résidus Glu542 et Met622 [Roth G.J. et al. Biochemistry 25 (1986) 8357-8361]. Le plasmide pYG1217 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B). Dans d'autres modes de réalisation, l'utilisation des techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR permet de générer à volonté des variants du fragment de restriction MstII-HindIII de la Figure 1 mais délétés d'un ou plusieurs sites de fixation aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène.

E.2.5. Peptide du type P1-X*-P2.

E.2.5.1. Altération conformationnelle par substitution des résidus cystéine.

Les produits de l'amplification PCR des plasmides p5E et p7E avec les oligodéoxynucléotides Sq2149 (5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCGGTG-AAGCCGGC-3', les sites BamHI et MstII sont soulignés) et Sq2029 sont d'abord clonés dans un vecteur de type pUC sous la forme d'un fragment de restriction BamHI, et la séquence d'un clone est vérifiée par séquençage. La séquence du fragment MstII-HindIII ainsi généré correspond à la séquence correspondante donnée à la Figure 1 à l'exception que les résidus 471 et 474 du vWF sont des résidus glycine et non des résidus cystéine. Le plasmide pYG1271 comporte ce fragment de restriction MstII-HindIII précédé du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B). Le plasmide pYG1269 est généré

de façon similaire à l'exception que le plasmide p7E est utilisé comme matrice lors de l'amplification PCR par les oligodéoxynucléotides Sq2149 et Sq2029.

E.2.5.2. Altération conformationnelle par introduction de mutations du type IIB

- 5 D'autres mutations particulièrement utiles concernent au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type IIB associées au vWF (augmentation de l'affinité intrinsèque du vWF pour la GP1b), comme les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val551, Val553, Pro574 ou Arg578 par exemple. Les techniques de recombinaison génétique *in vitro* permettent également d'introduire à volonté un ou
- 10 des résidus supplémentaires dans la séquence du vWF et par exemple une méthionine surnuméraire entre les positions Asp539 et Glu542. Dans une exemplification particulière, les mutations Arg543->Trp543 (R543W) et Pro574->Leu574 (P574L) sont introduites par mutagenèse dirigée à l'aide des oligodéoxynucléotides 5'-GTGCTGAAGGCCTTTGTGGTCGACATGATGGA-
- 15 GTGGCTGCGGATATCCCAGAAGTGGGTAGCGGTGGCCGTGGTGGAGTACC-3' (Sq2851; le codon spécifiant le résidu Arg543 est souligné) et 5'-GGGCTCAAGGACCGGAAGCGCTTAAGCGAGCTGCGGCGCATTGCC-AGCCAG-3' (Sq2855; le codon spécifiant le résidu Leu574 est souligné), respectivement. Après vérification de la séquence nucléotidique, on génère ainsi des
- 20 fragments de restriction MstII-HindIII incluant les mutants de type IIB du vWF humain R543W et P574L. Les plasmides pYG1359 (R543W) et pYG1360 (P574L) comportent ces fragments de restriction MstII-HindIII précédés du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4 et Figure 3B). La mutagenèse à l'aide de l'oligodéoxynucléotide Sq2851 introduit également les sites SalI, EcoRV et
- 25 MluI aux positions Val538, Ile546 et Val551, respectivement. Ces sites de restriction ne sont pas présents dans la séquence correspondante naturelle du vWF humain et sont donc particulièrement utiles pour introduire facilement toute mutation désirable entre les résidus Val538 et Val551. A titre d'exemple, les oligodéoxynucléotides 5'-ATCCCAGAAGTGGCGTA-3' (Sq3017, le codon spécifiant le mutant de type IIB Cys550 est souligné) et 5'-CGCGTACGCACTTCTGGGAT-3'
- 30 (Sq3018) forment en s'appariant un fragment de restriction EcoRV-MluI qui peut être cloné dans le plasmide pYG1359 coupé par les enzymes EcoRV et MluI, ce qui génère le plasmide pYG1374 comportant les mutations R543W et W550C (Figure 3B). De la même façon, les oligodéoxynucléotides 5'-

TCGACATGATGGAGCGGCTGCGGAT-3' (Sq3019, le codon spécifiant le résidu Arg543 provenant de la séquence naturelle est souligné) et 5'-ATCCGCAGCCGCTCCATCATG-3' (Sq3020) forment en s'appariant un fragment de restriction SaII-EcoRV qui peut être cloné dans le plasmide pYG1374 coupé par les enzymes SaII et EcoRV, ce qui génère le plasmide pYG1386 qui ne comporte que la mutation W550C (Figure 3B).

EXEMPLE 3: CONSTRUCTION D'UN FRAGMENT DE RESTRICTION MstII/HindIII INCLUANT UN SITE DE LIAISON DU vWF AU SOUS-ENDOTHELIUM

Dans un mode de réalisation particulier, les sites de liaison du vWF aux composants du tissu sous-endothélial et du collagène en particulier, sont générés par amplification PCR du plasmide pET-8c52K. Par exemple l'utilisation des oligodéoxynucléotides Sq2258 (5'-GGATCCTTAGGGCTG-TGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', le site MstII est souligné) et Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTAACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', le site HindIII est souligné) permet de générer le plasmide pYG1254 dont le fragment de restriction MstII-HindIII inclus les résidus Cys509 à Cys695 du vWF naturel (peptide de type X). La ligature de ce fragment de restriction avec le fragment de restriction HindIII-MstII du plasmide pYG404 (cf. Exemple 4) génère le fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1276 (Figure 3B).

Des variants moléculaires des types XD (cf. E.2.4.) ou X* (cf. E.2.5.) peuvent également être générés selon la même stratégie et qui comportent toute combinaison souhaitable entre les sites de fixation du vWF aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène et/ou tout résidu responsable d'une modification de l'affinité du vWF pour la GP1b (pathologies de type II associée au vWF). Dans un autre mode de réalisation, le domaine capable de se fixer au collagène peut également provenir du fragment du vWF compris entre les résidus 911 et 1114 et décrit par Pareti et al. [J. Biol. Chem. (1987) 262: 13835-13841].

EXEMPLE 4: COUPLAGE EN C-TERMINAL DE LA SAH

Le plasmide pYG404 est décrit dans la demande de brevet EP 361 991. Ce plasmide comporte un fragment de restriction HindIII codant pour le gène de la prépro-SAH précédé des 21 nucléotides naturellement présents immédiatement en

amont de l'ATG initiateur de traduction du gène PGK de S. cerevisiae. Ce fragment comporte un fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (résidus leucine-glycine-leucine). La ligature de ce fragment avec l'un quelconque
5 des fragments MstII-HindIII décrits dans les exemples 2 ou 3 permet de générer des fragments de restriction HindIII incluant des gènes composites codant pour des protéines chimères dans lesquelles un fragment du vWF doué de propriétés particulières est positionné en phase traductionnelle de lecture en C-terminal de la molécule de SAH. De tels gènes composites sont exemplifiés dans le Tableau de la
10 Figure 3B.

EXEMPLE 5: COUPLAGE EN N-TERMINAL DE LA SAH

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre
15 un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant un fragment du vWF doué de propriétés d'adhésivité et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII ce qui permet de générer des plasmides
20 d'expression de ces protéines chimères, par exemple selon la stratégie détaillée dans l'exemple suivant.

EXEMPLE 6: PLASMIDES D'EXPRESSION

Les protéines chimères des exemples précédents peuvent être exprimées dans les levures à partir de promoteurs fonctionnels, régulables ou constitutifs, tels que,
25 par exemple, ceux présents dans les plasmides pYG105 (promoteur LAC4 de Kluyveromyces lactis), pYG106 (promoteur PGK de Saccharomyces cerevisiae), pYG536 (promoteur PHO5 de S. cerevisiae), ou des promoteur hybrides tels que ceux décrits dans la demande de brevet EP 361 991. Les plasmides pYG105 et pYG106 sont ici particulièrement utiles car ils permettent l'expression des gènes
30 codés par les fragments de restriction HindIII des exemples E.4. et E.5. à partir de promoteurs fonctionnels chez K. lactis, régulables (pYG105) ou constitutifs (pYG106). Le plasmide pYG105 correspond au plasmide pKan707 décrit dans la

demande de brevet EP 361 991 dans lequel le site de restriction HindIII unique et localisé dans le gène de résistance à la généticine (G418) a été détruit par mutagenèse dirigée tout en conservant une protéine inchangée (oligodeoxynucleotide 5'-GAAATGCATAAGCTCTTGCCATTCTCACCG-3'). Le fragment SalI-SacI 5
codant pour le gène URA3 du plasmide muté a été ensuite remplacé par un fragment de restriction SalI-SacI comportant une cassette d'expression constituée du promoteur LAC4 de K. lactis (sous la forme d'un fragment SalI-HindIII) et du terminateur du gène PGK de S. cerevisiae (sous la forme d'un fragment HindIII-SacI). Le plasmide pYG105 est mitotiquement très stable chez les levures
10 Kluyveromyces et une carte de restriction en est donnée à la Figure 3. Les plasmides pYG105 et pYG106 ne diffèrent entre eux que par la nature du promoteur de transcription encodé par le fragment SalI-HindIII. A titre d'exemple, le clonage, "dans l'orientation productive" (définie comme l'orientation qui place la région "prépro" de l'albumine de façon proximale par rapport au promoteur de
15 transcription), des fragments de restriction HindIII des plasmides pYG1220, pYG1310, pYG1373, pYG1309, pYG1350, pYG1210, pYG1204, pYG1217, pYG1269, pYG1271, pYG1359, pYG1360, pYG1374, pYG1386 et pYG1276, dans le site HindIII du plasmide pYG105 génère respectivement les plasmides d'expression pYG1248, pYG1313, pYG1375, pYG1311, pYG1355, pYG1214,
20 pYG1206, pYG1223, pYG1279, pYG1283, pYG1361, pYG1365, pYG1377, pYG1389 et pYG1277.

EXEMPLE 7: TRANSFORMATION DES LEVURES

La transformation des levures appartenant au genre Kluyveromyces, et en particulier les souches MW98-8C et CBS 293.91 de K. lactis, s'effectue par exemple
25 par la technique de traitement des cellules entières par de l'acétate de lithium [Ito H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168], adaptée comme suit. La croissance des cellules se fait à 28°C dans 50 ml de milieu YPD, avec agitation et jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) comprise entre 0,6 et 0,8 ; les cellules sont récoltées par centrifugation à faible vitesse, lavées dans une solution stérile de TE
30 (10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA), resuspendues dans 3-4 ml d'acétate lithium (0,1 M dans du TE) pour obtenir une densité cellulaire d'environ 2×10^8 cellules/ml, puis incubées à 30°C pendant 1 heure sous agitation modérée. Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension résultante de cellules compétentes sont incubés

- à 30°C pendant 1 heure en présence d'ADN et à une concentration finale de 35 % de polyéthylène glycol (PEG4000, Sigma). Après un choc thermique de 5 minutes à 42°C, les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 0,2 ml d'eau stérile et incubées 16 heures à 28°C dans 2 ml de milieu YPD pour permettre l'expression
- 5 phénotypique du gène de résistance au G418 exprimé sous contrôle du promoteur P_{k1} (cf. EP 361 991) ; 200 µl de la suspension cellulaire sont ensuite étalés sur boîtes YPD sélectives (G418, 200 µg/ml). Les boîtes sont mises à incuber à 28°C et les transformants apparaissent après 2 à 3 jours de croissance cellulaire.

EXEMPLE 8: SECRETION DES CHIMERES

- 10 Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter les protéines chimères entre SAH et vWF. Quelques clones correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple, avec les plasmides pYG1214 (SAH-P1), pYG1206 (SAH-P2), pYG1223 (SAH-P1-XD-P2) et pYG1248 (SAH-P1-X-P2) ou pKan707 (vecteur
- 15 témoin) sont mis à incuber en milieu YPD ou YPL à 28°C. Les surnageants cellulaires sont récupérés par centrifugation quand les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance, éventuellement concentrés 10 fois par précipitation pendant 30 minutes à -20°C dans une concentration finale de 60 % d'éthanol, puis testés après électrophorèse en gel SDS-PAGE à 8.5 %, soit directement par
- 20 coloration du gel par du bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires des anticorps de souris dirigés contre le vWF ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la SAH. Lors des expériences de détection immunologique, le filtre de nitrocellulose est d'abord incubé en présence des anticorps primaires spécifiques, lavé plusieurs fois, incubé en présence d'anticorps
- 25 de chèvre anti-souris (immunoblot anti-vWF) ou anti-lapin (immunoblot anti-SAH), puis incubé en présence d'un complexe avidine-péroxydase en utilisant le "kit ABC" distribué par Vectastain (Biosys S.A., Compiègne, France). La réaction immunologique est ensuite révélée par addition de diamin-3,3' benzidine tetrachlorhydrate (Prolabo) en présence d'eau oxygénée, selon les recommandations
- 30 du fabricant. Les résultats des Figures 4 à 8 démontrent que la levure K. lactis est capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces chimères sont reconnues par des anticorps spécifiques de la SAH ou du vWF.

EXEMPLE 9: PURIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES PRODUITS SECRETES

Les chimères présentes dans les surnageants de culture correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple par les plasmides d'expression selon l'exemple 6, sont caractérisées dans un premier temps à l'aide d'anticorps spécifiques de la partie SAH et de la partie vWF. Les résultats des Figures 4 à 8 démontrent que la levure *K. lactis* est capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces chimères sont immunologiquement réactives. Il peut être également souhaitable de purifier certaines de ces chimères. La culture est alors centrifugée (10000 g, 30 min), le surnageant est passé à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8) puis purifié sur colonne. Par exemple, le concentrat correspondant au surnageant de culture de la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 est purifiée par chromatographie d'affinité sur Bleu-Trisacryl (IBF). Une purification par chromatographie d'échange d'ions peut également être utilisée. Par exemple dans le cas de la chimère SAH-vWF470-713, le concentrat obtenu après ultrafiltration est dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse de cations (S Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La colonne est alors lavée plusieurs fois par la solution de Tris HCl (50 mM pH 8) et la protéine chimère est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 8) puis redéposées sur colonne S Fast Flow. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] sécrétée par la levure CBS 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 1). Le caractère essentiellement monomérique des protéines chimères entre SAH et vWF est également confirmé par leur profil d'élution sur colonne TSK 3000 [Toyo Soda Company, équilibrée par une solution de cacodylate (pH 7) contenant 0,2 M de Na₂SO₄] : par exemple la chimère [SAH-vWF 470-704 C471G,

C474G] se comporte dans ces conditions comme une protéine de poids moléculaire apparent de 95 kDa démontrant son caractère monomérique.

EXEMPLE 10: ACTIVITE ANTAGONISTE DES HYBRIDES GENETIQUES ENTRE SAH ET VWF POUR L'AGGLUTINATION PLAQUETTAIRE

- 5 L'activité antagoniste des produits est déterminée par mesure de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au paraformaldéhyde selon la méthode décrite par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66]. Les mesures se font dans un agrégamètre (PAP-4, Bio Data, Horsham, PA, USA) qui enregistre les variations au cours du temps de la transmission optique sous
- 10 agitation à 37°C en présence de vWF, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions (concentrations). Pour chaque mesure, 400 µl (8x10⁷ plaquettes) d'une suspension de plaquettes humaines stabilisées au paraformaldéhyde (0,5 %, puis resuspendues en [NaCl (137 mM) ; MgCl₂ (1 mM) ; NaH₂PO₄ (0,36 mM) ; NaHCO₃ (10 mM) ; KCl (2,7 mM) ; glucose (5,6 mM) ; SAH (3,5 mg/ml) ;
- 15 tampon HEPES (10 mM, pH 7,35)] sont préincubés à 37°C dans la cuve cylindrique (8,75 x 50 mm, Wellcome Distriwell, 159 rue Nationale, Paris) de l'agrégamètre pendant 4 min puis sont additionnés de 30 µl de la solution du produit à tester à différentes dilutions dans du véhicule de formulation apyrogène [mannitol (50 g/l) ; acide citrique (192 mg/l) ; L-lysine monochlorhydratée (182,6 mg/l) ; NaCl
- 20 (88 mg/l) ; pH ajusté à 3,5 par addition de NaOH (1M)], ou de véhicule de formulation uniquement (essai contrôle). La suspension résultante est alors incubée pendant 1 min à 37°C et on ajoute 12,5 µl de vWF humain [American Bioproducts, Parsippany, NJ, USA ; 11 % d'activité von Willebrand mesurée selon les recommandations d'utilisation du PAP-4 (Platelet Aggregation Profiler^R) à l'aide de
- 25 plaquettes fixées au formaldéhyde (2x10⁵ plaquettes/ml), de plasma humain contenant de 0 à 100 % de vWF et de ristocétine (10 mg/ml, cf. p. 36-45: vW ProgramTM] que l'on incube à 37°C pendant 1 min avant d'ajouter 12,5 µl de la solution de botrocétine [purifiée à partir de venin lyophilisé de *Bothrops jararaca* (Sigma), selon le protocole décrit par Sugimoto et al., Biochemistry (1991) 266: 18172]. L'enregistrement de la lecture de la transmission en fonction du temps est
- 30 alors réalisée pendant 2 min sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté (Wellcome Distriwell) placé dans la cuve et sous une agitation magnétique de 1100 tr/min assurée par l'agrégamètre. La variation moyenne de la transmission optique (n³⁵

pour chaque dilution) au cours du temps est donc une mesure de l'agglutination plaquettaire due à la présence de vWF et de botrocétine, en l'absence ou en présence de concentrations variables du produit à tester. A partir de tels enregistrements, on détermine alors le % d'inhibition de l'agglutination plaquettaire due à chaque

5 concentration de produit et on trace la droite donnant le % d'inhibition en fonction de l'inverse de la dilution de produit en échelle log-log. La CI50 (ou concentration de produit provoquant 50 % d'inhibition de l'agglutination) est alors déterminée sur cette droite. Le Tableau de la Figure 9 compare les CI50 de quelques unes des chimères SAH-vWF de la présente invention et démontre que certaines d'entre elles

10 sont de meilleurs antagonistes de l'agglutination plaquettaire que le produit RG12986 décrit par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66] et inclus dans les essais à titre de valeur étalon. Des tests identiques de l'inhibition de l'agglutination de plaquettes humaines en présence de vWF de plasma de porc (Sigma) permet en plus de démontrer que certains des hybrides de la présente invention, et notamment

15 certains variants de type IIB, sont de très bons antagonistes de l'agglutination plaquettaire en l'absence de co-facteurs de type botrocétine. L'antagonisme botrocétine-indépendant de ces chimères particulières peut également être démontré selon le protocole initialement décrit par Ware et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 2946] par déplacement de l'anticorps monoclonal ^{125}I -LJ-IB1 (10 mg/ml), un

20 inhibiteur compétitif de la fixation du vWF sur la GPIb plaquettaire [Handa M. et al., (1986) J. Biol. Chem. 261: 12579] après 30 min d'incubation à 22°C en présence de plaquettes fraîches (10^8 plaquettes/ml).

LISTE DE SEQUENCES

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 2591 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 26..2587

REVENDICATIONS

1. Polypeptide recombinant composé d'une partie adhésive dérivée de la structure du vWF capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF aux plaquettes et/ou au sous-endothélium, et d'une partie permettant sa stabilisation et sa présentation in vivo.
5
2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisée en ce que la partie adhésive est constituée par tout ou partie de la séquence peptidique comprise entre les résidus 445 et 733 du vWF ou d'un variant de celle-ci.
3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que la partie
10 adhésive présente une structure choisie parmi :
 - (a) la séquence peptidique comprise entre les résidus 445-733 du vWF, ou,
 - (b) une partie de la séquence peptidique (a) capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
 - (c) une structure dérivée des structures (a) ou (b) par modifications
15 structurales (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et capable d'antagoniser au moins partiellement la liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium, ou,
 - (d) une séquence peptidique non naturelle, par exemple isolée à partir de banques peptidiques aléatoires, et capable d'antagoniser au moins partiellement la
20 liaison du vWF au GP1b et/ou au sous-endothélium.
4. Polypeptide selon la revendication 3 caractérisé en ce que la partie adhésive est constituée par une séquence choisie parmi les peptides de type P1, P2, X, XD et X* ou par toute combinaison de ces peptides entre-eux.
5. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce que la
25 combinaison des peptides est choisie parmi les peptides de type P1-P2, P1-X, P1-XD, P1-X*, X-P2, XD-P2, X*-P2, P1-X-P2, P1-XD-P2 et P1-X*-P2.
6. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce que la partie adhésive est constituée par tout peptide d'un type défini dans les revendications 4 et 5 représenté plus d'une fois.

7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la partie adhésive est couplée à l'extrémité N-terminale de la structure stabilisatrice.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la partie adhésive est couplée à l'extrémité C-terminale de la structure stabilisatrice.

5 9. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est un polypeptide possédant une demie-vie plasmatique élevée.

10 10. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que le polypeptide possédant une demie-vie plasmatique élevée est une protéine telle qu'une albumine, une apolipoprotéine, une immunoglobuline ou encore une transferrine.

15 11. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que le polypeptide possédant une demie-vie plasmatique élevée est dérivé par modification(s) structurale(s) (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus, modification chimique) d'une protéine selon la revendication 10.

12. Polypeptide selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est un polypeptide faiblement ou non-immunogénique pour l'organisme dans lequel il est utilisé.

20 13. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est une albumine ou un variant de l'albumine.

14. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

25 15. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence "leader" permettant la sécrétion du polypeptide exprimé.

16. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 ou 15 sous le contrôle d'une région d'initiation de la transcription et éventuellement d'une région de terminaison de la transcription.

17. Plasmide autorépliatif comportant une cassette d'expression selon la revendication 16.

18. Cellule recombinante eucaryote ou procaryote dans laquelle a été inséré une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 ou 15 ou une cassette
5 d'expression selon la revendication 16 ou un plasmide selon la revendication 17.

19. Cellule recombinante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure, d'une cellule animale, d'un champignon ou d'une bactérie.

20. Cellule recombinante selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

10 21. Cellule recombinante selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces.

22. Procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon l'une des revendications 18 à 21 dans des conditions d'expression, et on
15 récupère le polypeptide produit.

23. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

SEQ.ID NO: 1

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	-12
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His	9
CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln	29
TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe	49
GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu	69
TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp	89
TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	109
CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp	129
AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe	149
TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	169
CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly	189
AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg	209
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala	229
GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	249

Figure 1 (a)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp	269
TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys	289
ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe	309
GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met	329
TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu	349
GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC <u>GCT GCA</u> GAT CCT CAT GAA TGC Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys	369
TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys	389
CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	409
CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn	429
CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala	449
GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val	469
AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser	489
GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe	509
CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu	529
GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp	549
GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala	569
MstII	
GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT <u>GCC TTA GGC</u> TTA ACC TGT GAA GCC Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala	589
SAH<---I--->VWF	

Figure 1 (b)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG GTG GTG CCT CCC ACA GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT
 Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr 609

CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC GAT TTC TAC ^{PstI} TGC AGC AGG CTA CTG
 Leu Tyr Val Glu ~~Asp~~ Ile Ser Glu ~~Pro~~ Pro Leu His Asp Phe ~~Tyr~~ Cys Ser Arg Leu Leu 629

GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GGC TCC TCC AGG CTG TCC GAG GCT GAG TTT GAA GTG CTG
 Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu 649

AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CCG CTG CCG ATC TCC CAG AAG TGG GTC CCG GTG
 Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val 669

GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC GGC TCC CAC GCC TAC ATC GGG CTC AAG GAC CCG AAG CGA
 Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg 689

CCG TCA GAG CTG CCG CCG ATT GCC AGC CAG GTG AAG TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC
 Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser 709

ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC TTC AGC AAG ATC GAC CCG CCT GAA
 Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu 729

GCC TCC CCG ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG GAG CCC CAA CCG ATG TCC CCG AAC
 Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn 749

TTT GTC CCG TAC GTC CAG GGC CTG AAG AAG AAG AAG GTC ATT GTG ATC CCG GTG GGC ATT
 Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile 769

GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG CAG ATC CCG CTC ATC GAG AAG CAG GCC CCT GAG AAC AAG
 Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys 789

GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG CAA AGG GAC GAG ATC GTT AGC TAC
 Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr 809

CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT CTG CCC CCC GAC ATG GCA CAA GTC
 Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro ~~Pro~~ Thr Leu Pro ~~Pro~~ Asp Met Ala Gln Val 829

TAA GCCT

Figure 1 (c)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Figure 2A

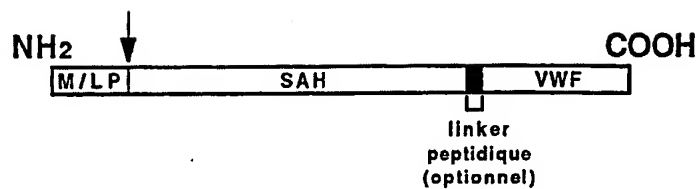


Figure 2B

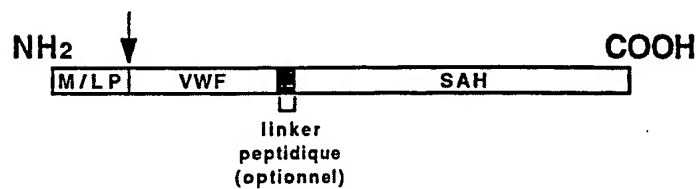


Figure 2C

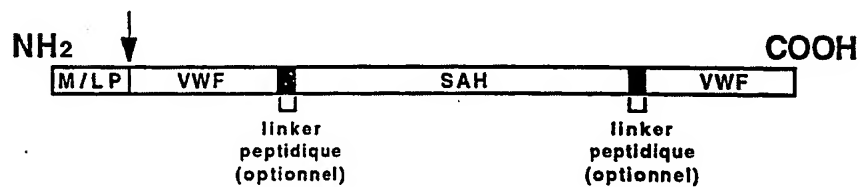


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

5/12

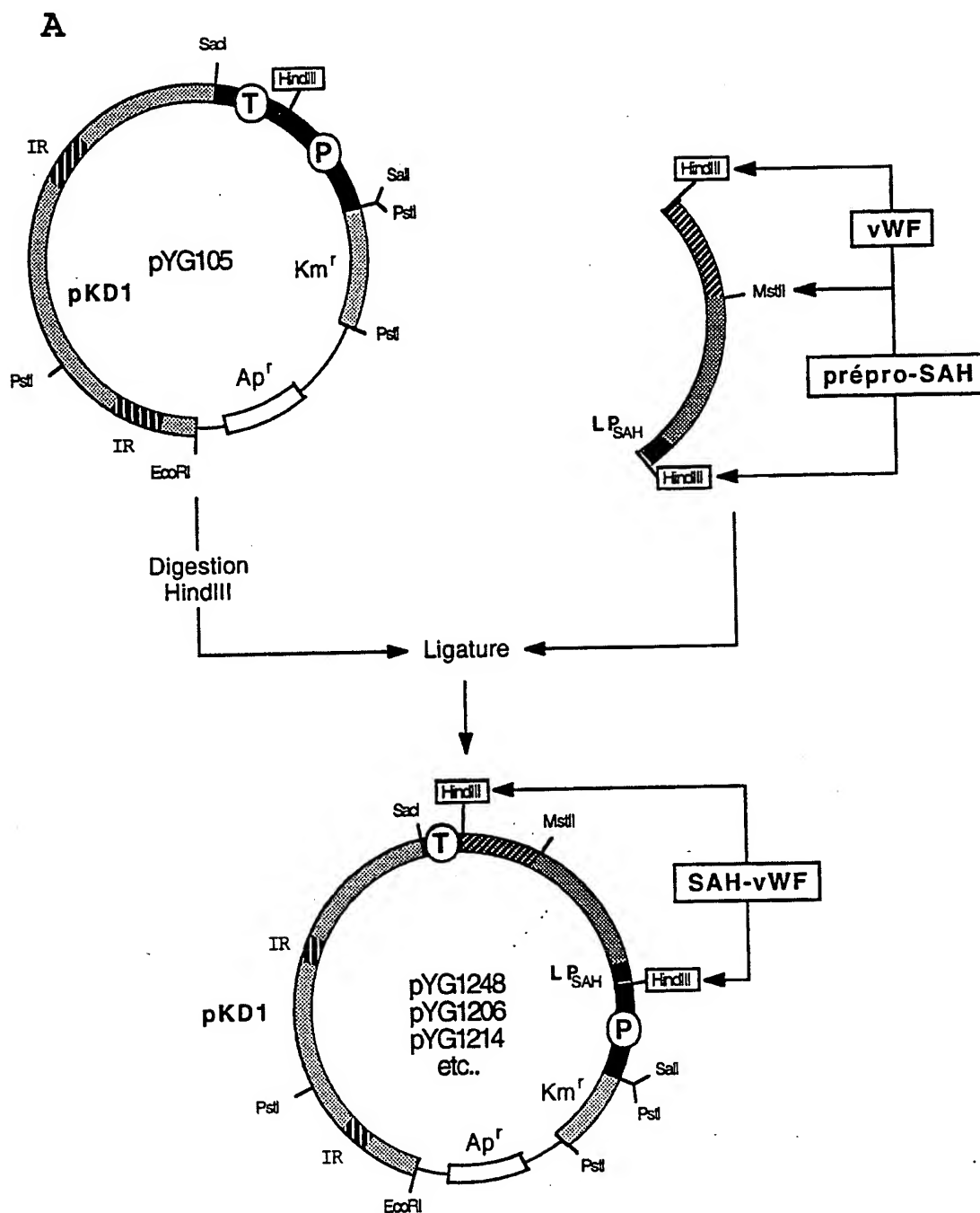


Figure 3 (a)

6/12

B

PLASMIDE HSA-vWF	STRATEGIE D'OBTENTION	CARACTERISTIQUES	O-GLYCOSYLATION POTENTIELLE	PLASMIDE D'EXPRESSION
pY61220	PCR sur pET-8c52K (Sq1969+Sq2029)	vWF470->713	T485; T492; T493; S500; T705	pY61248
pY61310	PCR sur p5E (Sq2149+Sq2622)	vWF470->704 C471G; C474G	T485; T492; T493; S500	pY61313
pY61373	PCR sur pET-8c52K (Sq3037+Sq2622)	vWF494->704	S500	pY61375
pY61309	PCR sur pET-8c52K (Sq2621+Sq2622)	vWF508->704	NONE	pY61311
pY61350	substitution du fragment MstII-PstI de pY61309 par Sq2751+Sq2752	vWF502->704	NONE	pY61355
pY61210	PCR sur pET-8c52K (Sq1969+Sq1970)	vWF470->498	T485; T492; T493;	pY61214
pY61204	insertion du fragment MstII-BglII au site MstII de la SAH	vWF694->708	T705	pY61206
pY61217	PCR sur pMMB9 (Sq1969+Sq2029)	vWF470->713 Δ509-662	T485; T492; T493; S500; T705	pY61223
pY61269	PCR sur p7E (Sq2149+Sq2029)	vWF470->713 C471G; C474G; C509G; C695G	T485; T492; T493; S500; T705	pY61279
pY61271	PCR sur p5E (Sq2149+Sq2029)	vWF470->713 C471G; C474G	T485; T492; T493; S500; T705	pY61283
pY61359	mutagenèse par Sq2851	vWF470->704 C471G; C474G; R543W	T485; T492; T493; S500	pY61361
pY61360	mutagenèse par Sq2855	vWF470->704 C471G; C474G; P574L	T485; T492; T493; S500	pY61365
pY61374	substitution du fragment EcoRV-MluI de pY61359 par Sq3017+Sq3018	vWF470->704 C471G; C474G; R543W; W550C	T485; T492; T493; S500	pY61377
pY61386	substitution du fragment SalI-EcoRV de pY61374 par Sq3019+Sq3020	vWF470->704 C471G; C474G; W550C	T485; T492; T493; S500	pY61389
pY61276	PCR sur pET-8c52K (Sq2258+Sq2259)	vWF509->695	NONE	pY61277

Figure 3 (b)

7/12

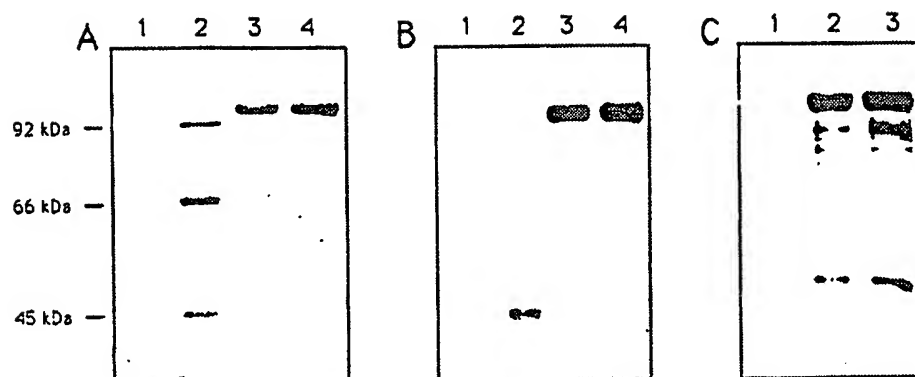


Figure 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

8/12

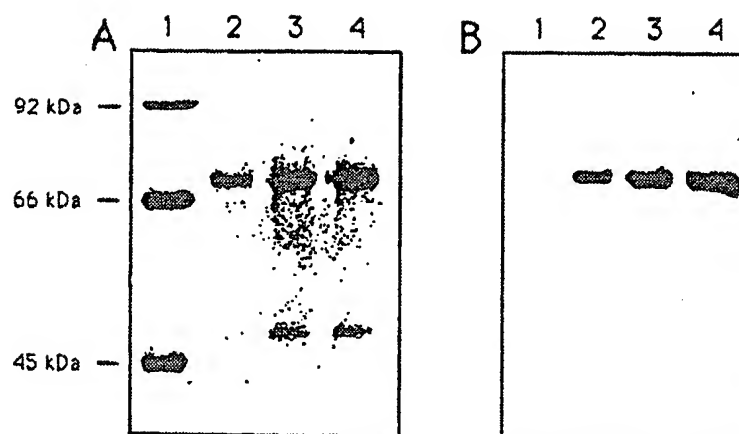


Figure 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9/12

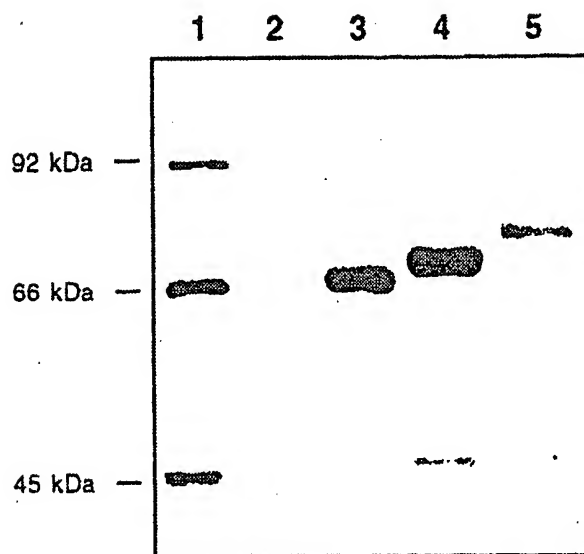


Figure 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10/12

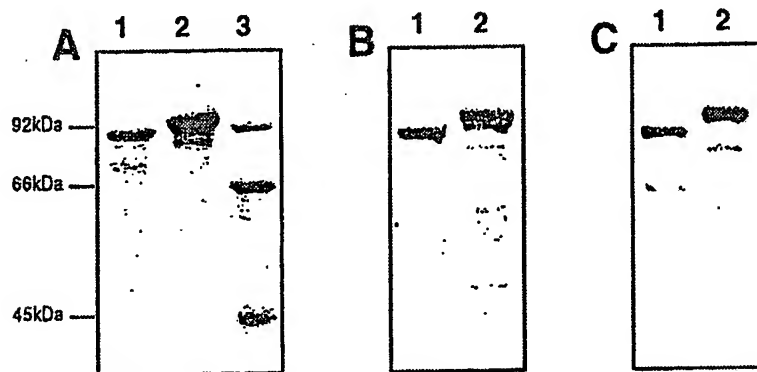


Figure 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT

11/12

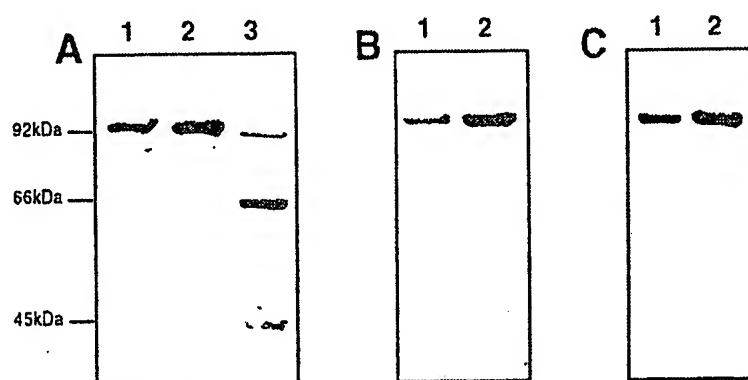


Figure 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT

12/12

PRODUIT	CI ₅₀ (nM)
RG12986	50
SAH-vWF ₆₉₄₋₇₀₈	50000
SAH-vWF ₄₇₀₋₇₁₃ C471,474->G	20
SAH-vWF ₄₇₀₋₇₀₄ C471,474->G	<10

Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/FR93/00087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 Int. cl.⁵ : C12.N 15/12; C12N 15/62; C12N 15/14; C12N 5/10 A61K 37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int. Cl.⁵ : C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0 255 206 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 3 February 1988, cited in the application see the whole document	1-23
Y	WO, A, 9 113 093 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORPORATION) 5 September 1991, see the whole document	1-23
Y	EP, A, 0 413 62 (RHONO-POULENC SANTE) 20 February 1991, cited in the application see the whole document	1-23
P,Y	WO, A, 9 300 357 (RHONE POULENC RORER INT HOLDING) 7 January 1993, see the whole document	1-23
P,Y	WO, A, 9 217 192 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 15 October 1992, see the whole document	1-23
P,Y	WO, A, 9 206 999 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 30 April 1992, see the whole document	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 1993 (16.06.93)

Date of mailing of the international search report

2 July 1993 (02.07.93)

 Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/FR93/00087

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY . (MICROFILMS) Vol. 263, NO.34, 5 December 1988, BALTIMORE, MD US pages 17901-17904 MOHRI, H. ET AL. 'Structure of the von Willebrand Factor domain interacting with glycoprotein Ib' cited in the application see the whole document ---	1-23
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. Vol. 164, No.3, 15 November 1989, DULUTH, MINNESOTA US pages 1339-1347 PIETU, G. ET AL. 'Production in Escherichia coli of a biologically active subfragment of von Willebrand Factor corresponding to the platelet glycoprotein Ib, collagen and heparin binding domains' see the whole document -----	1-23

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300087
SA 70241

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 16/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0255206	03-02-88	AU-B- 617981	12-12-91
		AU-A- 7371587	03-12-87
		JP-A- 63152396	24-06-88

WO-A-9113093	05-09-91	AU-A- 7496491	18-09-91
		EP-A- 0517826	16-12-92

EP-A-0413622	20-02-91	FR-A- 2650598	08-02-91
		CA-A- 2022539	04-02-91
		JP-A- 3178998	02-08-91

WO-A-9300357	07-01-93	AU-A- 2297792	25-01-93

WO-A-9217192	15-10-92	AU-A- 1757592	02-11-92
		AU-A- 9069591	20-05-92
		WO-A- 9206999	30-04-92

WO-A-9206999	30-04-92	AU-A- 9069591	20-05-92
		AU-A- 1757592	02-11-92
		WO-A- 9217192	15-10-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00087

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 0 10px;"> CIB 5 C12N15/12; A61K37/02 C12N15/62; C12N15/14; C12N5/10 </div>	
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE	
Documentation minimale consultée ⁸	
Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹	
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰	
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³
Y	EP,A,0 255 206 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 3 Février 1988 cité dans la demande voir le document en entier ---
Y	WO,A,9 113 093 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORPORATION) 5 Septembre 1991 voir le document en entier ---
Y	EP,A,0 413 622 (RHONO-POULENC SANTE) 20 Février 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---
-/--	
No. des revendications visées ¹⁴	
1-23 1-23 1-23	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> ^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹ "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée </div> <div style="width: 45%;"> "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. "&" document qui fait partie de la même famille de brevets </div> </div>	
IV. CERTIFICATION	
2 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16 JUIN 1993</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">02 -07- 1993</div>
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">CHAM BONNET F.J.</div>

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,Y	WO,A,9 300 357 (RHONE POULENC RORER INT HOLDING) 7 Janvier 1993 voir le document en entier ---	1-23
P,Y	WO,A,9 217 192 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 15 Octobre 1992 voir le document en entier ---	1-23
P,Y	WO,A,9 206 999 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 30 Avril 1992 voir le document en entier ---	1-23
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS) vol. 263, no. 34, 5 Décembre 1988, BALTIMORE, MD US pages 17901 - 17904 MOHRI, H. ET AL. 'Structure of the von Willebrand Factor domain interacting with glycoprotein Ib' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 164, no. 3, 15 Novembre 1989, DULUTH, MINNESOTA US pages 1339 - 1347 PIETU, G. ET AL. 'Production in Escherichia coli of a biologically active subfragment of von Willebrand Factor corresponding to the platelet glycoprotein Ib, collagen and heparin binding domains' voir le document en entier -----	1-23

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300087
SA 70241

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

16/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0255206	03-02-88	AU-B- 617981	12-12-91
		AU-A- 7371587	03-12-87
		JP-A- 63152396	24-06-88

WO-A-9113093	05-09-91	AU-A- 7496491	18-09-91
		EP-A- 0517826	16-12-92

EP-A-0413622	20-02-91	FR-A- 2650598	08-02-91
		CA-A- 2022539	04-02-91
		JP-A- 3178998	02-08-91

WO-A-9300357	07-01-93	AU-A- 2297792	25-01-93

WO-A-9217192	15-10-92	AU-A- 1757592	02-11-92
		AU-A- 9069591	20-05-92
		WO-A- 9206999	30-04-92

WO-A-9206999	30-04-92	AU-A- 9069591	20-05-92
		AU-A- 1757592	02-11-92
		WO-A- 9217192	15-10-92

EPO FORM P002

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.